pISSN 1976-7447, eISSN 2287-7363
J Biomed Transl Res 2016;17(1):020-025
http://dx.doi.org/10.12729/jbtr.2016.17.1.020
Received 9 Mar 2016, Revised 30 Mar. 2016, Accepted 31 Mar. 2016

Original Article

Immunomodulatory effects mixed with *Weissella cibaria* JW15 and Black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Extract

Ho eun Park, Youn jung Jang, Wan kyu Lee*

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

The objective of this study was to investigate the immunomodulatory effects mixed with *Weissella cibaria* JW15 strain and black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). In this experiment, JW15 was cultured in De Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth at 37% for 17 hr, and the cells were washed twice with sterile phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2). And black soybean was extracted by ethanol or hot boiling water. The immuno-modulatory effects of mixed JW15 and black soybean extract were investigated by measuring the production of nitric oxide (NO), nuclear factor κB (NF-κB) and cytokine (Interleukin-1β and Tumor necrosis factor-α) in RAW 264.7 macrophage cells or RAW blue cells. The 0.1 % ethanol and hot water extract of black soybean increased NO, NF-κB, and cytokine production in a concentration dependent manner. The NF-κB activation by JW15 mixed with 0.1 % hot water extract of black soybean (0.26 ± 0.02) was significantly higher than JW15 alone (0.20 ± 0.02). Also, combination of JW15 and 0.1% hot water extract of black soybean triggered IL-1β production of 110.19 ± 4.38 pg/mL, which was significantly greater than the JW15 alone (12.06 ± 7.58 pg/mL). The results of this study indicate that combination of *Weissella cibaria* JW15 and black soybean extract may have an ability to activate innate immune response synergistically. According to these results, the mixture of JW15 and black soybean extract could hold great promise for use in probiotics.

Key words: *Weissella cibaria JW15, Probiotics*, *Immunomodulatory effect*, Black soybean, *Glycine max* (L.) Merr

Introduction

생균제 (probiotics) 는 1989년 Fuller에 의해 장내미생물총의 균형을 개선함으로써 숙주동물에게 유익하게 작용하는 살아있는 미생물 첨가물로 정의되었다 [1]. 현재 사람과 동물의 생균제로 많이 사용하고 있는 유산균 (lactic acid bacteria) 은 대부분 탄수화물을 에너지원으로 사용하여 최종 대사산물로 유산 (lactic acid) 을 생산하기 때문에, 보통 다른 미생물에게는 치명적인 높은 산도에서 견디는 능력을 지니고 있다 [1]. 또한 생균제는 면역조절인자에 작용하여 장내 면역반응을 증가시키고 [2], 혈중 IgG의 수준을 높이며 [3], 식세포의 활성과 면역기능을 개선시키는 등 면역조절 능력이 있는 것으로 알려져 있다 [1].

최근에 *Weissella* 속 세균은 유산균군에 포함되었는데, 1993년에 처음으로 Collins 등이 *Leuconostoc* 속 (Genus) 의 다른 종들과 차이를 보이는 *Leuconostoc paramesenteroides*와 *Lactobacillus* 속 5종을 모아서 6종으로 새로운 *Weissella* 속을 제안함으로써 만들어졌으며, 현재 14종의 *Weissella* 속 세균이 공식적으로 알려져 있다 [4]. *Weissella* 속은 그람 양성 무아포 형성균으로 카탈라아제 음성이며 이산화탄소와 젖산을 생성하는 이상유산 발효경로 (heterolactic fermentation) 를 통해 포도당을 유산과 이산화탄소로 발효시킨다. 또한 *Weissella*는 인간과 동물의 위장관, 김치와 같은 발효야채, 그리스의 살라미 소시지, 스페인의 사탕수수와 같은 발효음식에서 많이 검출되고 있는 것으로 알려지고 있다 [5].

*Weissella cibaria*는 2002년에 Björkroth 등에 의해 처음으로 명명되었는데, 2004년 Ennahar 등은 2002년 한국의 Choi 등이 김치에서 우점종으로 분리, 명명한 *Weissella kimchii*가 Björkroth 등이 명명한 *Weissella cibaria*와 동일 균종임을 확인하여 보고하기도 하였다 [6]. *Weissella cibaria*는 김치와 같은 발효음식에서 우점종으로 분리되고 있으며, weissellicin과 같은 항균물질 생산 및 avian influenza virus에 대한 항바이러스 효과도 보고되고 있으며, 염증 매개물질의 생산에 관여하여 면역효과를 나타낸다는 연구결과 등이 보고되고 있다 [7]. 김치에서 분리된 유산균주 *Weissella cibaria* JW15 (JW15) 는 선행연구에서 내산성, 내담즙성, 내열성, 병원성 억제능과 같은 생균제로서의 특성을 가지고 있는 것으로 보고되었으며 macrophages cell에서의 nuclear

***Corresponding author:** Wan kyu Lee,
College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, 28644, Korea
Tel: +82-10-4452-2960, E-mail: wklee@cbu.ac.kr

factor κB (NF-κB)를 활성화시키고 nitric oxide (NO), interleukin (IL)-1β 및 tumor necrosis factor (TNF)-α 생성을 촉진시켜 면역조절 효과가 우수한 것으로 확인되었다 [8].

면역체계에서 macrophage는 monocyte로부터 분화된 세포로 면역학적 항상성과 감염에 대한 숙주의 선천성 및 후천성 면역반응에 있어서 중요한 역할을 하게 된다. Macrophage는 미생물이나 lipopolysaccharide (LPS), lipoteichoic acids (LTA) 같은 미생물 구성요소에 의해 활성화되고, NO나 염증 초기에 작용하는 대표적인 IL-1β와 TNF-α 같은 염증성 cytokine을 분비하여 숙주의 면역을 조절하는 역할을 하고 있다 [9-12]. NO는 L-arginine의 nitric oxide synthetase 효소로부터 생성되는 물질로 단시간 동안 존재하는 반응 중간산물이며, 암세포나 미생물의 성장을 저해하는 것으로 알려져 있다 [13, 14]. IL-1β는 감염이나 염증에 대해 면역반응을 유발하는 초기 급성 반응의 중요한 매개물질로 숙주세포의 증식, 분화, 소멸 등과 같은 다양한 세포반응을 유도하고 다른 cytokine과 chemokine의 분비를 유도해 면역 연쇄반응을 촉발시키기도 한다 [15, 16]. TNF-α는 세균감염과 악성종양 발생 시 염증과정을 조절하거나 intracellular pathogen을 억제하여 숙주의 면역체계 내에서 광범위한 영향을 미친다 [17]. 이러한 cytokine들은 외부침입에 대해 숙주의 면역 방어 기작에 기여하고, 종종 암 환자나 바이러스 감염환자들은 cytokine에 의해 치료되기도 한다 [18]. NF-κB는 DNA 전사조절에 관여하는 단백질 복합체이다. 또한 NF-κB는 염증성 cytokine 유전자의 발현에 관여하고 감염을 방어하기 위한 cytokine 생산으로 면역반응을 조절하는 중요한 역할을 하기도 한다 [19].

서리태(검은콩, *Glycine max* (L.) Merr)는 예로부터 한국인들이 해독제나 치료제 등의 건강식품과 전통 한방재료로 사용하고 있는 다소비 식품소재 중의 하나이기도 하다. 서리태에는 식이성 섬유, 올리고당, 이소플라본, 사포닌, 콩단백질, 식물성 스테롤과 페놀 화합물 등이 다량으로 함유되어 있으며, 특히 종피에 다량으로 함유되어있는 안토시아닌은 항암, 항산화, 항바이러스, 면역증강 등의 다양한 생리활성 효과가 있는 것으로 알려지고 있지만, 서리태 추출물의 면역조절 효과에 대해서는 많은 연구가 이루어지지 않은 상태이다. [20]

따라서 본 연구는 RAW 264.7 cells에서의 서리태 에탄올 및 열수추출물과 *Weissella cibaria* JW15 유산균의 면역활성효과를 NO, NF-κB, cytokine (IL-1β와 TNF-α) 측정을 통해 확인하고, 추출물과 유산균 혼합의 면역증강 시너지 효과를 검증할 목적으로 진행되었다.

Materials and Methods

유산균 배양

김치에서 분리한 *Weissella cibaria* JW15 (KACC 91811) 균주는 De Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth (BD, USA) 에서 30°C, 24시간 배양한 후, MRS plate를 이용하여 균수를 측정하였다. 또한 배양액 전체를 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액은 버리고 균체만을 멸균된 phosphate buffered saline (PBS; pH 7.2) 으로 2회 세척 후, 110°C에서 15분간 열처리하여 유산균을 사멸시킨 후, 1.0×10^8 CFU/mL로 희석하여 *in vitro* 면역활성 측정용 시료로 사용하였다 [8].

서리태 추출물 준비

서리태 에탄올과 열수추출물은 충남 금산 소재 금산국제인삼약초연구소에서 제공받은 추출물을 본 실험에 사용하였다. 서리태 (*Glycine max* (L.) Merr) 는 증류수와 에탄올 (94**%**) 40mL에 각각 동결건조 분말 2g을 혼합하여 200 rpm으로 25°C, 24시간동안 교반 추출을 실시하였다. 교반 추출 후 Whatman No. 3로 여과하고, 40°C에서 회전진공농축기를 이용하여 각 용매를 제거하였다. 각 추출된 최종 추출물들은 동결건조 후 보관하며, PBS로 희석 (w/v) 하여 0.1%, 0.01%, 0.001%를 제조하여 실험에 사용하였다.

세포배양

RAW 264.7 macrophages (Korean Cell Line Bank, Korea)와 RAW BLUE cells (InvivoGen, USA)은 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco Laboratories, USA), 100 unit/mL의 streptomycin과 penicillin (Gibco Laboratories)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM: HyClone, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. RAW BLUE cells은 4~5번 계대배양 후, 100 mg/mL의 Zeocin (InvivoGen, USA)을 처리하였다 [8].

Macrophages 활성화

RAW 264.7 macrophages와 RAW BLUE cells은 12 well plate의 각 well당 5×10^5 cells/mL가 되도록 분주하여 2시간 안정화 시킨 후, 새로운 배지로 교체하여 주었다. 그 후 1.0×10^8 CFU/mL농도로 맞춘 heat-killed한 JW15 유산균 시료 100 μL, 서리태 에탄올, 열수추출물을 각각 100 μL를 첨가하여 48시간 배양하였다. 염증 반응 모델은 100, 500, 1,000 ng/mL LPS (Sigma, USA)를 처리하였으며, 48시간 후 배양 상층액만을 모아 NO, NF-κB와 cytokine (IL-1β, TNF-α)의 농도를 측정하였다 [8].

NO 측정

NO의 농도는 Griess reagent (Promega, USA) 를 이용하여 측정하였다. 50 μL의 macrophage 배양액과 nitrite standard (0~100 μM sodium nitrite) 에 1% sulfanilamide가 함유된 5% phosphoric acid 50 μL 와 0.1% N-1-naphthyl ethylenediamine dihydrochloride 50 μL를 섞고 실온의 암실에서 10분간 방치한 후, 540 nm에서 microplate reader (Tecan, Austria) 를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 측정한 흡광도 값을 standard 표준곡선을 이용하여 NO의 생성농도로 계산하였다 [21].

NF-κB 측정

Secreted alkaline phosphatase reporter gene이 안정적으로 transfection된 RAW BLUE cells을 이용하여 NF-κB pathway를 활성화시키는지 확인하였다. 12 well plate에 5.0×10^5 cell/mL RAW BLUE cells을 분주하고 2시간 안정화 시킨 후, JW15균주와 에탄올 및 열수 추출물을 각각 접종하여 48시간 배양하였다. 양성대조물질로는 100 ng/mL LPS (Sigma, USA) 를 사용하였다. 배양 후 배양 상층액 20 μL와 QUANTI-Blue (InvivoGen, USA) 200 μL를 96 well plate에 혼합한 후 37°C에서 15분간 반응시켰으며, 반응이 끝난 후 620 nm에서 ELISA reader (Tecan, Austria) 를 사

용하여 흡광도를 측정하였다 [8].

Cytokine 측정

IL-1β와 TNF-α의 농도는 ELISA kits (eBioscience, USA) 를 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 coating buffer로 희석한 IL-1β와 TNF-α의 capture antibodies 100 μL를 4°C에서 하루 동안 코팅하였다. 0.05 % (v/v) 의 Tween 20 (Bioshop, Canada) 을 포함하는 PBS(PBST) 로 5번 세척 후, PBS로 희석한 10 % (v/v) FBS 200 μL를 1시간동안 비특이적인 단백질 결합을 막기 위해 반응시켰다. PBST로 5번 세척 후, IL-1β와 TNF-α의 standard와 macrophage 배양액 100 μL를 넣고 2시간동안 실온에서 배양하였다. 모든 standard와 sample은 3번씩 실시하였다. PBST로 다시 5번 세척 한 후, IL-1β와 TNF-α의 detection antibodies 100 μL를 1시간동안 실온에서 방치하였다. Plate를 PBST로 5번 세척 후, Avidin-HRP를 30분간 실온에서 반응시키고 PBST로 7번 세척하였다. 세척 후 100 μL의 Tetramethylbenzidine (TMB) 를 암실에서 15분 반응시키고 50 μL의 2N H_2SO_4로 반응을 멈추게 하였다. 반응이 끝난 plate를 450 nm에서 측정하고 흡광도값을 standard (0~1,000 pg/mL; IL-1β, TNF-α) 표준곡선을 이용하여 계산하였다 [8].

통계분석 및 유의성 검정

통계처리는 SPSS (Window ver. 12.0; SPSS, USA)를 이용하였으며 그룹간의 유의성 검정은 ANOVA와 Duncan's tests를 사용하였다 (P<0.05).

Results

서리태 에탄올 및 열수 추출물의 농도별 면역조절효과

서리태 에탄올 및 열수 추출물에 의한 NO, NF-κB 그리고 cytokine인 IL-1β, TNF-α의 생성량을 추출물의 농도별로 측정하였다. 그 결과 NO 생성량의 경우, 0.1% 서리태 열수추출물을 제외한 다른 농도의 서리태 추출물은 NO생성량을 증가시키지 못하였다. 그러나 0.1% 열수추출물 (4.59 ± 0.18 μM/mL) 은 다른 농도의 추출물보다 유의적인 NO 생성량 증가를 나타내었다. NF-κB의 경우, 0.1% 에탄올추출물과 열수추출물이 다른 농도 추출물보다 유의적으로 더 높은 NF-κB를 활성을 보였다. IL-1β의 경우, 에탄올 추출물은 농도의존성의 경향을 보이지 않았으며, 0.01% 에탄올추출물 (49.57 ± 1.43 pg/mL) 과 0.1% 에탄올추출물 (38.14 ± 4.71 pg/mL) 이 다른 군에 비해 유의적인 IL-1β 생성량 증가를 나타내었다. 0.1% 서리태 열수추출물의 TNF-α 생성량이 24.725.3 ± 146.88 pg/mL으로 가장 높은 수치를 나타내었으며, 0.1% 에탄올추출물에 비해 유의적인 증가를 나타내었다 (Fig. 1).

서리태 추출물과 *Weissella cibaria* JW15 혼합물의 농도별 면역조절효과

서리태 에탄올 및 열수추출물과 *Weissella cibaria* JW15 균주와의 혼합 시 나타나는 면역조절 시너지 효과를 확인하기 위하여, NO, NF-κB 및 cytokine (IL-1β, TNF-α) 의 생성량을 측정하였다. 그 결과 NO 생성량의 경우 가장 낮은 농도인 0.001% 서리태 열수추출물과 JW15 혼합군에서 NO 생성량 (12.65 ± 1.56 μM/mL) 이 가장 높게 측정되었으며, JW15 단독의 NO 생성량 (11.34 ± 0.45 μM/mL) 에 비해 유의적인 증가를 확인할 수 있었다. 그러나 서리태 에탄올 추출물과 JW15의 혼합군의 경우 JW15단독군과 비교하여 유의적인 시너지 효과를 관찰할 수 없었다. 에탄올 및 열수 추출물 모두 농도가 증가함에 따라 NO생성량은 감소하는 농도 비의존적인 패턴을 나타내었다. NF-κB의 경우, 모든 농도의 서리태 열수추출물 혼합군과 0.1% 에탄올추출물 혼합군에서 JW15

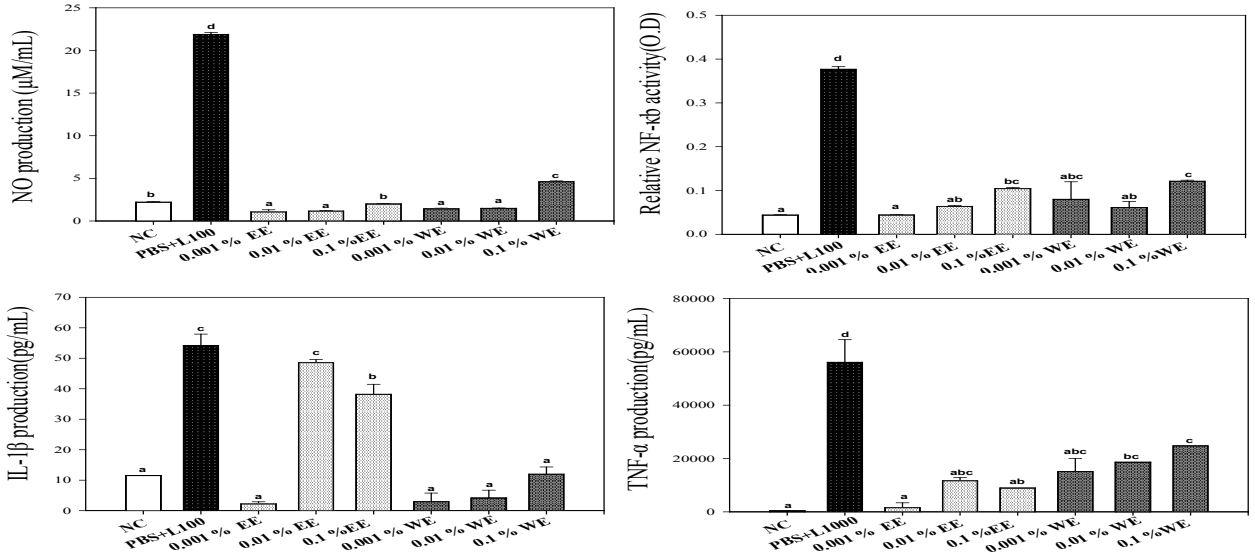

Fig. 1. Nitric oxide (NO), nuclear factor (NF)-κB, interleukin -1β and tumor necrosis factor (TNF)-α production by RAW 264.7 cells or RAW BLUE cells induced by three concentrations of ethanol and hot water extract of Black soybean. L100; lipopolysaccharide (LPS) at 100 ng/mL, L1000; LPS at 1000 ng/mL, EE; ethanol extract of black soybean, WE; water extract of black soybean. Different superscript letters (a, b, c, and d) indicate statistical differences as determined by ANOVA (P<0.05).

단독군에 비해 유의적으로 높은 NF-κB 생성을 유도하였다. IL-1β 측정 결과, 0.01%와 0.1% 열수추출물 혼합군에서 각각 24.15 ± 2.19 pg/mL과 110.19 ± 4.38 pg/mL로서 JW15 단독군의 12.06 ± 7.58 pg/mL보다 유의적인 증가 결과를 나타내었다. 그러나 TNF-α 생성량의 경우 서리태 에탄올 및 열수추출물 혼합군 모두에서 JW15 단독군에 비해 유의적인 증가 결과는 확인할 수 없었다 (Fig. 2).

Discussion

생균제 (Probiotics) 로써 사용되는 유산균들의 면역활성 증진효과는 많은 연구를 통해 보고되고 있다 [21]. 본 연구에서 사용한 유산균주인 *Weissella cibaria* JW15 또한 *in vitro* 상에서 NO, NF-κB와 cytokine 생산을 증가시켜 숙주의 면역활성을 증진시켜 숙주의 면역활성을 증진시키는 것으로 보고되어 있다 [8]. 본 실험에서 JW15균주와 혼합한 서리태 (*Glycine max* (L.) Merr.) 에 대해서 항산화 활성 및 항암 활성 등 생리활성에 대한 연구는 많이 진행되어 있으나 [22], 면역활성 증진에 대한 관련 연구는 부족한 상황이다. 따라서 본 연구에서는 JW15 유산균주와 서리태 에탄올, 열수추출물을 혼합하였을 때, 각 면역지표들 (NO, NF-κB, IL-1β 그리고 TNF-α) 의 생성능을 측정하여 유산균과 서리태 추출물의 면역증강 시너지효과 여부를 확인하는 실험을 실시하였다.

서리태 에탄올 추출물과 열수추출물을 농도별로 RAW 264.7 대식세포에 반응시켜 NO, NF-κB 그리고 cytokine 생성능을 측정한 결과, 서리태 추출물이 각 면역지표들의 생성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 이와 같은 면역지표들의 증가는 실험동물에게 검은콩을 투여하여 IL-2와 INF-γ의 생성을 증가시켰다는 보고와 유사한 결과로 생각된다 [23]. 검은콩 구성물질인 soy isoflavones가 LPS로 유도된 대식세포에서 NO의 생성을 저하시키는 항염증효과를 가진다는 연구가 많이 보고되고 있는데 [24], 본 실험에서는 반대로 NO와 염증성 cytokine의 생산량을 증가시켰다. 이러한 실험 결과는, 항염증효과를 지니는 soy isoflavones 이외의 검은콩 구성물질 중 면역활성을 증진시키는 물질에 의한 가능성이 있을 것으로 생각된다.

JW15균주와 서리태 추출물을 혼합하였을 때 나타나는 각 면역지표들의 조절능력을 확인한 결과, 추출방법에 따라 에탄올추출물보다 열수추출물의 면역활성능이 높은 것으로 확인되었다. 이것은 에탄올과 열수로 추출하는 과정 중 추출물의 성분 차이에 따라 나타나는 결과로 생각된다. 서리태 열수추출물과 유산균을 혼합하였을 때, 서리태 열수추출물이 TNF-α를 제외한 면역지표들의 생성을 JW15 단독으로 처리한 것보다 유의적으로 증가시키는 것으로 확인되었다. 특히 0.1%의 서리태 열수추출물의 경우 현저한 IL-1β의 생성을 유의적으로 증가시켰는데, 이러한 염증 cytokine의 증가는 숙주의 면역체계내의 균형을 유지시키고 감염에 대한 저항성을 증가시킨다는 보고와 유사성을 갖고 있다 [25]. Harata 등도 *Lactobacillus gasseri* TMC0356 경구투여가 IL-1β, TNF-α의 mRNA 발현을 증가시킨다는 연구보고를 발표하였다 [26]. 따라서 본 실험의 결과를 통해 JW15균주와 서리태추출물의 혼합물이 면역활성 능력을 나타내는 기전인 cytokine 활성변화를 유도하는 것으로 추측된다.

이상의 결과를 종합하여 보았을 때, 세포수준에서 서리태의 에탄올 추출물과 열수추출물 모두 NO, NF-κB 그리고 TNF-α의 생성을 증가시키는 면역증강효과를 지니고 있었으며, 또한 JW15와 서리태 열수추출물 혼합은 macrophage를 활성화시켜 NO, NF-κB 그리고 IL-1β의 면역증강 시너지효과를 나타내는 것으로 생각된다. JW15와 서리태추출물 혼합의 NO측정 결과에서는 고농도 (0.1%) 보다 저농도 (0.001%) 의 추출물과 유산균의 혼합에서 높은 NO 생성량을 나타내었는데, 이와 같은 결과는 재실험을 통해 확인이 필요한 것으로 보인다. 따라서 이번 결과를 바탕으로 향후 JW15와 서리태 열수추출물의 혼합물을 실험동물에게 경구

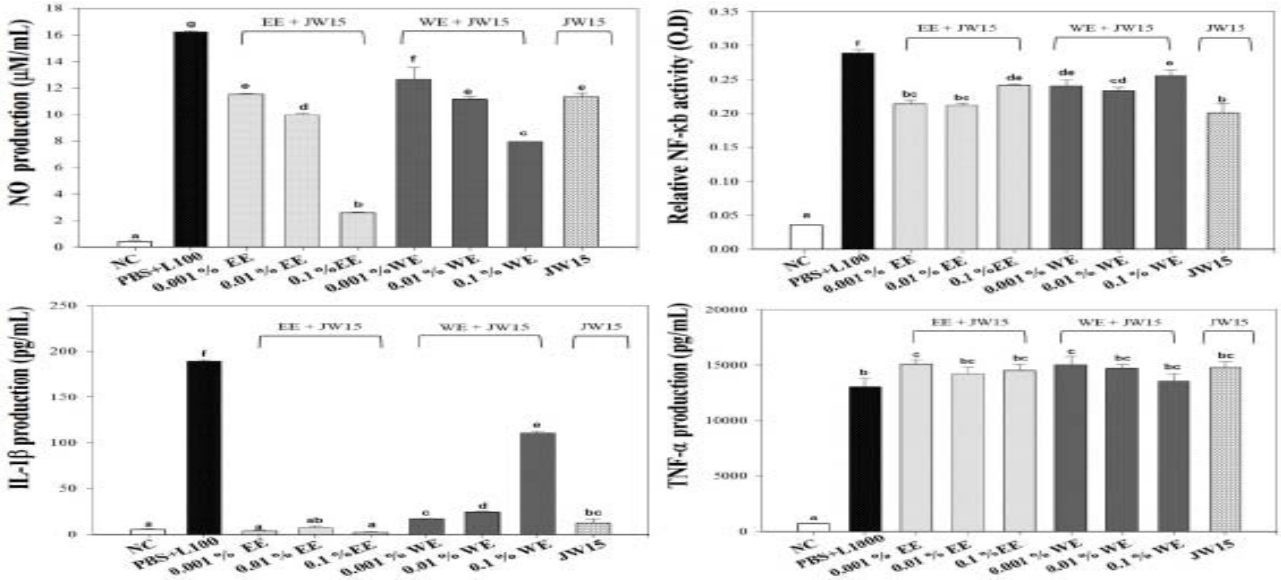

Fig. 2. Nitric oxide (NO), nuclear factor (NF)-κB, interleukin-1β and tumor necrosis factor (TNF)-α production by RAW 264.7 cells or RAW BLUE cells induced by ethanol and hot water extract of black soybean mixed with *Weissella cibaria* JW15. L100; Lipopolysaccharide (LPS) at 100ng/mL, L1000; LPS at 1000ng/mL, EE; ethanol extract of black soybean, WE; water extract of black soybean. Different superscript letters (a, b, c, d, e and f) indicate statistical differences as determined by ANOVA (P<0.05).

투여하여 *in vivo* 상에서도 면역증강 시너지효과가 발현된다면, *Weissella cibaria* JW15균주와 서리태 열수추출물의 혼합물은 면역력이 저하된 사람 및 동물의 건강기능성 식품소재로 활용될 가치가 매우 높을 것으로 기대된다.

Acknowledgements

이 논문은 2013년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

ORCID

Wan kyu Lee http://orcid.org/0000-0001-5087-6359

References

1. Fuller R. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol 1989;66:365-378.
2. Rolfe RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. J Nutr 2000;130:396S-402S.
3. Lecssard M, Brisson GJ. Effect of a Lactobacillus fermentation product on growth, immune response and fecal enzyme activity in weaned pigs. Can J Anim Sci 1987;67:509-516.
4. De Bruyne K, Camu N, De Vuyst L, Vandamme P. Weissella fabaria sp. nov., from a Ghanaian cocoa fermentation. Int J Syst Evol Microbiol 2010;60:1999-2005.
5. Padonou SW, Schillinger U, Nielsen DS, Franz CM, Hansen M, Hounhouigan JD, Nago MC, Jakobsen M. Weissella beninensis sp. nov., a motile lactic acid bacterium from submerged cassava fermentations, and emended description of the genus Weissella. Int J Syst Evol Microbiol 2010;60:2193-2198.
6. Ennahar S, Cai Y. Genetic evidence that Weissella kimchii Choi et al. 2002 is a later heterotypic synonym of Weissella cibaria Bjorkroth et al. 2002. Int J Syst Evol Microbiol 2004;54:463-465.
7. Kang MS, Lim HS, Kim SM, Lee HC, Oh JS. Effect of Weissella cibaria on Fusobacterium nucleatum-induced Interleukin-6 and Interleukin-8 Production in KB Cells. J Bacteriol Virol 2011;41:9-18.
8. Ahn SB, Park HE, Lee SM, Kim SY, Shon MY, Lee WK. Characteristics and immuno-modulatory effects of Weissella cibaria JW15 isolated from Kimchi, Korea traditional fermented food, for probiotic use. J Biomed Res 2013;14:206-211.
9. Marin ML, Lee JH, Murtha J, Ustunol Z, Pestka JJ. Differential cytokine production in clonal macrophage and T-cell lines cultured with bifidobacteria. J Dairy Sci 1997;80:2713-2720.
10. Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russell SW. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. J Biol Chem 1993;268: 1908-1913.
11. Schreiber RD, Hicks LJ, Celada A, Buchmeier NA, Gray PW. Monoclonal antibodies to murine gamma-interferon which differentially modulate macrophage activation and antiviral activity. J Immunol 1985;134:1609-1618.
12. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. Bull World Health Organ 1972;46:845-852.
13. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. J Biol Chem 1993;268:12231-12234.
14. Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. Sci Am 1992;266:68-71, 74-77.
15. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood 1996;87:2095-2147.
16. Introna M, Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, Dejana E, Mantovani A. IL-1 inducible genes in human umbilical vein endothelial cells. Eur Heart J 1993;14:78-81.
17. Derouich-Guergour D, Brenier-Pinchart MP, Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Tumour necrosis factor alpha receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. Int J Parasitol 2001;31:763-769.
18. Capuron L, Hauser P, Hinze-Selch D, Miller AH, Neveu PJ. Treatment of cytokine-induced depression. Brain Behav Immun 2002;16:575-580.
19. Cato AC, Wade E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. Bioessays 1996; 18:371-378.
20. Nizamutdinova IT, Kim YM, Chung JI, Shin SC, Jeong YK, Seo HG, Lee JH, Chang KC, Kim HJ. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells. Food Chem Toxicol 2009;47: 2806-2812.
21. Choi HJ, Shin MS, Lee SM, Lee WK. Immunomodulatory properties of Enterococcus faecium JWS 833 isolated from duck intestinal tract and suppression of Listeria monocytogenes infection. Microbiol Immunol 2012;56: 613-620.
22. Lim SY, Bae MS, Park KY, Kim KH. Effect of Doenjang with Black Soybean on Cytokine Production and Inhibition of Tumor Metastasis. Journal of Life Science 2009; 19:264-270.
23. Chan YC, Wu CC, Chan KC, Lin YG, Liao JW, Wang MF, Chang YH, Jeng KC. Nanonized black soybean enhances immune response in senescence-accelerated mice. Int J Nanomedicine 2009;4:27-35.
24. Sheu F, Lai HH, Yen GC. Suppression effect of soy isoflavones on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. J Agric Food Chem 2001;49:1767-1772.

25. Park SY, Ji GE, Ko YT, Jung HK, Ustunol Z, Pestka JJ. Potentiation of hydrogen peroxide, nitric oxide, and cytokine production in RAW 264.7 macrophage cells exposed to human and commercial isolates of Bifidobacterium. Int J Food Microbiol 1999;46:231-241.

26. Harata G, He F, Hiruta N, Kawase M, Kubota A, Hiramatsu M, Yausi H. Intranasal administration of Lactobacillus rhamnosus GG protects mice from H1N1 influenza virus infection by regulating respiratory immune responses. Lett Appl Microbiol 2010;50:597-602.